

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 31/00, 31/19, 31/04, 31/235	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/30003 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Oktober 1996 (03.10.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00539 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. März 1996 (22.03.96) (30) Prioritätsdaten: 195 11 623.2 30. März 1995 (30.03.95) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: KREUTZ, Werner [DE/DE]; Am Schloßberg, D-79219 Staufen (DE). (74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregentenstrasse 16, D-80538 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: MEDICAMENTS FOR THE SELECTIVE TREATMENT OF TUMOUR TISSUES (54) Bezeichnung: ARZNEISTOFFE ZUR SELEKTIVEN BEKÄMPFUNG VON TUMORGEWEBE (57) Abstract The invention provides medicaments having a strong cytotoxic effect largely selectively on tumour tissues. The invention is based on the fact that the external environment of cancer cells is in the acid range below 7 pH, while the physiological pH is at 7 to 7.5. The invention therefore proposes compounds for use as therapeutic active substances which are protonised at a pH of < 7 or at such a pH value release a substance whereby the protonised compound or the substance released has a stronger destructive action than the unprotonised compound or the compound before the release of the substance. The compounds of the invention are protonised or destroyed in the acid external environment of tumour cells and thus act to destroy them. (57) Zusammenfassung Erfindungsgemäß werden Arzneistoffe zur Verfügung gestellt, die eine starke cytotoxische Wirkung weitgehend selektiv auf Tumorgewebe aufweisen. Die Erfindung beruht darauf, daß das externe Milieu von Krebszellen im sauren Bereich von unter pH 7 liegt, während der physiologische pH-Wert bei 7-7,5 liegt. Erfindungsgemäß werden daher Verbindungen zur Verwendung als therapeutischer Wirkstoff vorgeschlagen, die bei einem pH-Wert von < 7 protoniert werden bzw. die bei einem solchen pH-Wert eine Substanz freisetzen, wobei die protonierte Verbindung oder die freigesetzte Substanz auf Zellen stärker zerstörend wirkt, als die unprotonierte Verbindung bzw. die Verbindung vor Freisetzen der Substanz. Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden im sauren externen Milieu von Tumorzellen protoniert bzw. zerfallen und wirken dann zellzerstörend.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Arzneistoffe zur selektiven Bekämpfung von Tumorgewebe

Die Erfindung betrifft neue Arzneistoffe, die selektiv Tumorgewebe bekämpfen, während gesundes Gewebe praktisch nicht angegriffen wird. Die neuen Arzneistoffe eignen sich daher hervorragend für die Krebstherapie.

Medikamente nach dem Stand der Technik, die bei der Chemotherapie eingesetzt werden, bringen in der Regel nur Teilerfolge, d.h. sie führen zu keiner endgültigen Heilung. Darüber hinaus wirken die im Stand der Technik eingesetzten Substanzen häufig nur bei einer bestimmten Tumorkategorie. Ein weiterer Nachteil der derzeit bekannten Chemotherapeutika sind ihre oft schädlichen Nebenwirkungen, da Chemotherapeutika generell auf proliferierende Gewebe cytostatisch wirken können. Die bekannten Chemotherapeutika sind auch bei der Bekämpfung der Metastasenbildung nicht zufriedenstellend und dies ist einer der Hauptgründe, die bislang einen entscheidenden Erfolg bei der Krebstherapie verhindern.

Daß Tumorgewebe im extrazellulären Milieu einen abgesenkten mittleren pH-Wert von etwa 6,5 bis 7,0 aufweist und der pH-Wert auf der Krebszellenoberfläche sogar bis 5 absinken kann, während der pH-Wert im Normalgewebe und im Blut etwa 7,2 bis 7,5 beträgt, ist bekannt und wird z.B. in der DE-A 44 07 484 und in Tumor Biol., 1994, 15: 304-310 beschrieben. In diesen Druckschriften wird offenbart, daß durch die Absenkung des

pH-Bereiches in Tumorzellen die natürlich Immunabwehr blockiert wird, da die körpereigenen Abwehrzellen mit voller Cytotoxizität nur im leicht basischen Milieu von mehr als 7 auf Krebs-Target-Zellen reagieren. Die DE-A 44 07 484 schlägt daher vor, das saure externe Milieu von Krebszellen auf das normale physiologische pH-Niveau von 7 bis 7,5 zu bringen und dadurch die Krebszellen durch die körpereigene Immunabwehr zu bekämpfen. Hierzu wird das saure externe Milieu von Krebszellen entweder durch künstliche Alkalisierungmaßnahmen oder durch die Verhinderung des Ansäuerungsprozesses selbst auf einen physiologischen pH-Wert von 7 bis 7,5 gebracht.

Die in der DE-A 44 07 484 beschriebenen Arzneimittel stellen zwar einen Fortschritt in der Krebstherapie dar, es wäre jedoch wünschenswert, Arzneimittel zur Verfügung zu haben, die neben der körpereigenen Immunabwehr Tumorzellen selektiv bekämpfen und damit als relativ nebenwirkungsarme Chemotherapeutika verwendet werden können.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Arzneistoffe zur Verfügung zu stellen, die eine starke cytotoxische Wirkung weitgehend selektiv auf Tumorgewebe aufweisen. Diese Aufgabe wird durch den Gegenstand der Patentansprüche gelöst.

Während in der DE-A 44 07 484 der Versuch unternommen wurde, den extrazellulären pH-Wert von Tumorgewebe zu erhöhen und damit das Tumorgewebe mittels der körpereigenen Abwehrstoffe zu zerstören, wird vorliegend ein anderer Weg beschritten. Das extrazelluläre Milieu in Tumorgewebe soll hinsichtlich des pH-Wertes gerade nicht verändert werden, sondern der erniedrigte pH-Wert im extrazellulären Tumorgewebe soll als Zielgebiet für Substanzen dienen, die pH-Wert-sensitiv sind, d.h. für Substanzen, die entweder im sauren Milieu protoniert werden und ausschließlich in diesem protonierten Zustand zellzerstörend wirken, oder für Substanzkomplexe, die im sauren Milieu zerfallen und dabei eine Substanz freisetzen, die zellzerstörend wirkt. Solche Substanzen bzw

Substanzkomplex werden aufgrund ihrer pH-Sensitivität nur in Krebstumoren und Metastasenbereichen aktiviert und stellen deshalb ein ideales Krebstherapeutikum dar. Auch ist besonders hervorzuheben, daß dieses neue Krebstherapeutikum unabhängig von der speziellen Krebsart generell auf alle Tumortypen wirkt.

Bevorzugt sind erfindungsgemäß Verbindungen, die nach ihrer Protonierung zellzerstörend wirken. Die Erfindung wird weiter anhand solcher Verbindungen beschrieben, die folgende Beschreibung gilt aber sinngemäß auch für Verbindungskomplexe, die sich im sauren Milieu des Tumorzellgewebes zersetzen und dabei eine zellzerstörende Substanz freisetzen.

Die protonierten Verbindungen können auf verschiedene Art und Weise wirken. So können die Verbindungen nach erfolgter Protonierung reversibel durch die Tumorzellmembran permeieren und auf diese Weise als Protonen-Carrier den Protonengradienten über die Tumorzellmembran abbauen. Der sich einstellende Effekt ist ein Anstieg des extrazellulären pH-Werts und ein Absinken des pH-Wertes im Zellinneren, was bis zum Zelltod der Krebszelle führen kann. Als Nebeneffekt tritt auf, daß solche Substanzen neben ihrer schädigenden Wirkung auf die Krebszelle durch die Erhöhung des pH-Wertes im Außenmilieu die natürliche Immunabwehrreaktion einleiten, wie in der DE-A 44 07 484 beschrieben. Es ist auch möglich Verbindungen einzusetzen, die sich nicht über die Membran von der wäßrigen Außenphase der Membran in die wäßrige Innenphase bewegen, sondern Substanzen, die in die Membran eingebaut werden und einen Protonentransfer durch die Membran ermöglichen. Solche Verbindungen bilden eine definierte Pore für Protonen, d.h. sie erlauben eine freie oder nur schwach eingeschränkte Diffusion von Protonen in Richtung ihres Konzentrationsgradienten.

Nützlich sind ebenfalls Verbindungen, die in protonierter Form vorliegen und die kation-, anion- oder

zellsubstratspezifisch wirken. Möglich sind hierbei z.B. Poren für Na^+ , K^+ , Cl^- , Aminosäuren oder Zucker.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt weisen die Verbindungen aber nach ihrer Protonierung im sauren Milieu toxische Eigenschaften auf und wirken als Zellgifte.

Erfindungsgemäß bevorzugte Verbindungen zur Verwendung als Arzneistoff weisen Molekülteile auf, die bei einem pH-Wert von weniger als 7, vorzugsweise weniger als 6,5 protoniert werden und in diesem protonierten Zustand toxisch für Krebszellen werden. Die Protonierung erfolgt bevorzugt bei einem pH-Wert von mehr als 5, besonders bevorzugt von mehr als 6. Die Verbindungen weisen bevorzugt ein Dissoziationsgleichgewicht auf, um eine reversible Protonierung bei dem gewünschten pH-Wert sicherzustellen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen müssen außerdem im Konzentrationsbereich der Wirksamkeit physiologisch verträglich sein, wobei die Toxizitätsgrenze vorzugsweise zwischen 200 mg/kg Körpergewicht/Tag bis 400 mg/kg Körpergewicht/Tag liegt. Die erfindungsgemäßen Verbindungen zur Verwendung als Arzneistoff sollen eine geeignete Wasserlöslichkeit besitzen, die vorzugsweise bei mindestens ca. 20 mg/ml besonders bevorzugt bei mindestens 30 mg/ml liegt.

Ein Fachmann kann mit Hilfe der vorstehenden Informationen Verbindungen, die erfindungsgemäß als Arzneistoff verwendet werden, unter Verwendung seines allgemeinen Fachwissens und einiger einfacher Versuche, wie sie nachstehend beschrieben werden, auffinden. So können die Toxizitätseigenschaften einer in Frage kommenden Substanz experimentell mit der FACScan- und der XTT-ELISA-Technik ermittelt werden. Beide Verfahren sind im Stand der Technik bekannt. Suspensierte Krebszelllinien wie z.B. K-562, Raji oder Daudi können mit beiden Techniken, adhärente Krebszelllinien lediglich mit der XTT-ELISA-Technik untersucht werden. Für die Untersuchung der Toxizität der Substanzen auf mononukleäre Blutzellen (MNCs)

können ebenfalls FACS- und XTT-Techniken eingesetzt werden. Bei der FACS-Technik wird der Anteil toter Zellen durch Propidium-Iodid-Anfärbung, beim XTT-Verfahren durch Umwandlung von XTT durch die Mitochondrien-Dehydrogenase in Formazan nachgewiesen. Die Verfahren sind beispielsweise in Tumor-Biologie 1994, 15, 304 und in dem Biochemiekatalog der Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland 0392.C 73.3.1465554 1 CB, Cat. No. 1465 015 beschrieben.

Für die Ermittlung pH-sensitiver toxischer Substanzen läßt man bei verschiedenen vorgegebenen pH-Werten, z.B. bei pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 und 7,5 ausgewählte Substanzen sowohl auf Tumorzelllinien als auch auf MNC's einwirken, z.B. 4 Stunden und 24 Stunden, um danach die Zahl der getöteten Krebszellen bzw. MNC's zu messen. Parallel dazu werden Kontrollmessungen ohne Zugabe pH-sensitiver Substanzen durchgeführt. Substanzen sind dann für therapeutische Zwecke geeignet, wenn sie auf Krebszellen gemäß der pH-Charakteristik toxisch wirken und auf MNC's und Erythrozyten im pH-Bereich von pH >7 keine oder nur geringfügige Toxizität aufweisen. Mit diesen in-vitro-Messungen an Zelllinien unter definierten experimentellen Bedingungen kann der Fachmann unter Zuhilfenahme seines allgemeinen Fachwissens Verbindungen auffinden, die erfindungsgemäß zur Bekämpfung von Krebszellen geeignet sind.

Zu beachten ist, daß jede Tumorart einen intrinsischen mittleren interzellulären pH-Wert aufweist, der z.B. bei Brusttumoren ca. 6,7 und bei Colontumoren ca. 6,9 beträgt. Um zu vermeiden, daß die Therapie in unmittelbarer Nähe des physiologischen pH-Wertes durchgeführt werden muß und damit unter Umständen Gefährdungen von normalen Zellen und Blutzellen erfolgen, können die pH-Werte im extrazellulären Tumorgewebe um ca. 0,5 pH-Einheiten abgesenkt werden, indem man durch Glucoseverabreichung Acidosen induziert.

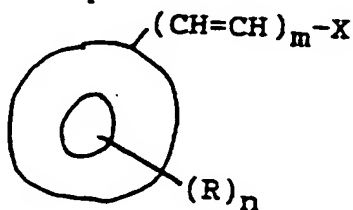
Erfindungsgemäß geeignete Verbindungen sind beispielsweise Verbindungen mit einem aromatischen System und einer substituierten Carboxyl-, Hydroxyl-, Sulfo-, und/oder

Aminogruppe. Bevorzugt handelt es sich bei dem aromatischen System um eine Phenyl- oder Naphtylgruppe oder um ein heteroaromatisches System mit 5 bis 10 Atomen, wobei vorzugsweise 1 oder 2 Atome Heteroatome darstellen, bevorzugt Stickstoff- oder Sauerstoffatome. Beispielfhaft kann Pyridin genannt werden. Besonders bevorzugt ist das aromatische System eine Phenylgruppe.

Das aromatische System trägt Substituenten, die durch ihren induktiven oder mesomeren Effekt die Dissoziationskonstante der Carboxyl-, Amino-, Sulfo- oder Hydroxylgruppe geeignet verändern, so daß eine Protonierung bzw. Deprotonierung im gewünschten pH-Bereich erfolgt. Wie durch geeignete Substitution eines aromatischen Systems die Dissoziationskonstante erhöht bzw. erniedrigt wird, ist bekannt und kann allgemeinen Lehrbüchern der organischen Chemie entnommen werden.

Salicyläure und Acetylsalicylsäure sind erfindungsgemäß nicht bevorzugt.

Geeignete Verbindungen weisen dann die Struktur



auf, wobei \odot ein konjugiertes, vorzugsweise aromatisches System bedeutet, m 0 oder größer, bevorzugt 0 bis 3 und besonders bevorzugt 0 oder 1 ist, X eine Carboxyl-, Hydroxyl-, Sulfo- und/oder Aminogruppe ist, die Reste R unabhängig voneinander beliebige Substituenten darstellen, die so gewählt werden, daß die Dissoziationskonstante für die Gruppe X im gewünschten pH-Wertbereich liegt und n eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist.

Bevorzugt stellt X eine Carboxyl- oder Hydroxylgruppe dar und die Reste R stellen insgesamt bevorzugt einen elektronenziehenden Effekt zur Verfügung. Geeignete Reste R sind z.B. Amino-, Hydroxyl-, gegebenenfalls mit C₁-10-Alkyl substituierte Amino-, Nitro- und Cyanogruppen, Halogenatome, insbesondere Fluor- oder Chloratome, Alkoxyreste mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen und Ester- oder Sulfonatreste mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen.

Die Reste R werden so gewählt, daß der Rest X bei einem pH-Wert von mehr als 7 deprotoniert vorliegt (bzw. im Fall einer Aminogruppe als -NH₂ vorliegt) und in dem gewünschten pH-Bereich, z.B. bei etwa 6,5 protoniert wird. Die Verbindung wird mittels der vorstehend beschriebenen Routineverfahren so ausgewählt, daß sie im deprotonierten Zustand eine wesentlich geringere Cytotoxizität aufweist als im protonierten Zustand.

Als besonders wirkungsvoll haben sich

2,4-Dihydroxybenzoesäure

4-Amino-2-hydroxybenzoesäure

Halogenierte 2-Hydroxybenzoesäure

Zimtsäure

deren Derivate und

Dinitrophenol erwiesen.

Als Beispiel wirksamer Derivate werden angeführt:

4-Acetoxy-2-hydroxybenzoesäure

4-Propionsäureester-2-hydroxybenzoesäure

4-Bernsteinsäureester-2-hydroxybenzoesäure

4-Glutarsäureester-2-hydroxybenzoesäure

4-Acetamino-2-acetoxybenzoesäure

2,4-Diacetoxybenzoesäure

5-Chlor-2-acetoxybenzoesäure

5-Brom-2-acetoxybenzoesäure

3-Fluorzimtsäure

3,4-Difluorzimtsäure

Als Molekülkomplexe die bei pH < 7 zerfallen und toxische Substanzen freisetzen kommen z.B. Komplexe aus Gallensäuren oder Fettsäuren und einer komplexbildenden toxischen

Substanz, z.B. Nopol (6,6-Dimethyl-2-norpinen-2-ethanol), in Frage.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden 2 oder mehrere erfindungsgemäße Verbindungen im Gemisch eingesetzt, oder nacheinander in derart kurzen Zeitabständen verabreicht, daß sich ihre Wirkungen geeignet ergänzen.

Die Wirksamkeit des 4-Bernsteinsäureesters der 2,4-Dihydroxybenzoesäure, der trans-3,4-Difluorzimtsäure und des 2,4-Dinitrophenols wurde überprüft. Hierbei wurden die vorstehend beschriebenen Methoden der FACScan- und ELISA-Technik verwendet. Figur 1A zeigt die Wirksamkeit des 4-Bernsteinsäureesters der 2,4-Dihydroxybenzoesäure auf K-562-Krebszellen. Es wird deutlich, daß die Toxizitätswirkung bei ca. pH 6,5 einsetzt und bei pH 5,7 ihr Maximum erreicht. In Figur 1B ist die Wirkungsweise der gleichen Verbindung auf mononukleare Blutzellen (MNC's) gezeigt. Bei einem extrazellulären pH-Wert im Bereich von 7,2 bis 7,4, wie er bei normalem Gewebe und bei Blutzellen vorherrscht, kann keine nennenswerte Toxizität festgestellt werden. In Figur 2A ist die Wirkung von trans-3,4-Difluorzimtsäure auf K-562-Zellen wiedergegeben. Es wird deutlich, daß eine nennenswerte cytotoxische Wirkung erst bei einem extrazellulären pH-Wert von weniger als 6,5 auftritt. In Figur 2B ist die Wirkung der gleichen Verbindung auf MNC's dargestellt.

Die entsprechenden Werte für 2,4-Dinitrophenol sind in Figur 3A und 3B gezeigt.

Es ist dem Fachmann offensichtlich, daß durch leichte Veränderungen in den Substituenten der vorstehend genannten Verbindungen die pH-Bereiche, bei denen das Dissoziationsgleichgewicht liegt, d.h. bei denen die Protonierung der Verbindungen erfolgt, nach oben oder unten verschoben werden können.

Alle beispielhaft genannt n Verbindungen zeigen eine Wasserlöslichkeit von mehr als 30 mg/ml.

Die vorstehend genannten drei beispielhaften Verbindungen wurden ebenfalls im Tiermodell auf ihre in-vivo-Tauglichkeit überprüft. Als Tiermodell werden Nacktmäuse gewählt, denen verschiedene humane Tumore implantiert werden können. Hierdurch ist es möglich die therapeutische Wirksamkeit der Substanzen unter definierten reproduzierbaren Bedingungen zu überprüfen. In Fig. 4 wird ein derartiger Tierversuch dokumentiert. Es wird ein Routineverfahren, wie es im Stand der Technik üblich und nachstehend skizziert ist, angewandt.

Den Nacktmäusen wird ein kleinzelliger Lungentumor (LXFS 650) implantiert, dessen extrazellulärer pH-Wert von etwa 6,9 nahe dem physiologischen pH-Wert von 7,2-7,3 liegt. Als Therapie-Substanz wird wie bei Fig. 1 2,4-Dihydroxybenzoesäure (Substanz (1)) eingesetzt. 3-4 Wochen nachdem der Tumor eingepflanzt wurde, werden 15 Mäuse, die Tumore von 5-7mm Durchmesser tragen, in 3 Gruppen eingeteilt: die erste 5-er Gruppe wird als Kontrollgruppe ohne Therapie geführt, bei der zweiten 5-er Gruppe wird die Substanz (1) in einer Konzentration von 200 mg/kg/Tag und bei der dritten 5-er Gruppe mit einer Konzentration von 400 mg/kg/Tag in die Schwanzvene injiziert. Im vorliegenden Versuch wurden an 4 aufeinanderfolgenden Tagen 4 Injektionen in die Schwanzvene durchgeführt. Die dadurch gesetzten Venenschäden ließen weitere Injektionen nicht zu. Am 7., 10., 14., und 17. Tag wurden die Tumorumfänge bestimmt. Aus Fig. 4 geht hervor, daß bei einer Konzentration von 400 mg/kg/Tag nach dem 7. Tag ein Wachstumsstillstand erreicht wird bis zum 10. Tag, danach beginnt der Tumor wieder zu wachsen, da die Therapie nicht weiter fortgesetzt wurde. Bei 200 mg/kg/Tag setzt eine schwache Wirkung erst am 10. Tag ein.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auf an sich bekannte Art und Weise zu Arzneimitteln für Säuger, bevorzugt Menschen, formuliert werden. In den Arzneimitteln liegen die

erfindungsgemäßen Verbindungen im Gemisch mit einem pharmazeutischen organischen oder anorganischen Träger, der für enterale oder parenterale Verabreichungen geeignet ist, vor. Die orale Verabreichung der erfindungsgemäßen Verbindung über Tabletten, Kapseln, Pulver oder in flüssiger Form, wie als Suspensionen, in Lösung, als Emulsion oder als Sirup ist besonders bevorzugt.

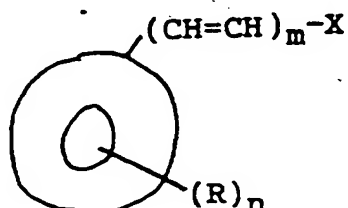
Bei der Formulierung als Tabletten werden übliche Arzneimittelträger wie Natriumcitrat, Lactose, mikrokristalline Cellulose und Stärke, Schmiermittel wie wasserfreie Kieselsäure, hydriertes Castoröl, Magnesiumstearat, Natriumlaurylsulfat und Talk, sowie Bindemittel wie Stärkepaste, Glucose, Lactose, Gummi-Arabicum, Mannit, Magnesiumtrisilicat und Talk verwendet. Wenn die erfindungsgemäßen Verbindungen als Flüssigkeiten verabreicht werden sollen, können übliche flüssige Träger verwendet werden.

Bevorzugt ist ebenfalls eine Formulierung für Injektionen und Infusionen, wie es auf dem Fachgebiet bekannt und in einschlägigen Standardwerken beschrieben ist.


Die Dosierungsform der erfindungsgemäßen Verbindung hängt sehr stark von der speziellen Verbindung ab und kann von einem Fachmann aufgrund des Zustandes des zu behandelnden Patienten, der Schwere und Art der zu behandelnden Krankheit, sowie möglicher Nebenwirkungen der verabreichten Substanz, bestimmt werden.

Patentanspruch

1. Verbindung, dadurch gekennzeichnet, daß sie bei einem pH-Wert von kleiner 7 protoniert wird oder eine Substanz freisetzt, wobei die protonierte Verbindung oder die freigesetzte Substanz auf Zellen stärker zerstörend wirkt als die unprotonierte Verbindung bzw. die Verbindung vor Freisetzen der Substanz, zur Verwendung als therapeutischer Wirkstoff.
2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Protonierung bzw. die Freisetzung der Substanz bei einem pH-Wert von 5 bis 7, insbesondere von 6 bis 7 erfolgt.
3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die protonierte Verbindung bzw. die freigesetzte Substanz Proton-, Kation- oder Aniongradienten über die Zellmembran abbaut, Zellsubstrate längs ihrer Konzentrationsgradienten über die Zellmembran transportiert oder ein Zellgift darstellt, das die Zellmembran passieren kann.
4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Dissoziationsgleichgewicht aufweist.
5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Wasserlöslichkeit von mindestens 20 mg/ml aufweist.
6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 der Formel

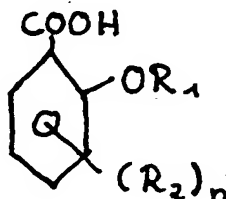


I

wobei  ein aromatisches System, insbesondere eine Phenylgruppe darstellt. m eine ganze Zahl von 0 bis 3 ist,

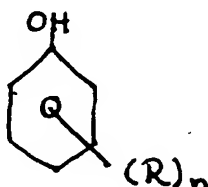
X ein Carboxyl-, Hydroxyl-, Sulfo- oder Aminogruppe ist, R unabhängig Amino-, Hydroxyl-, gegebenenfalls mit C₁-10-Alkyl substituierte Amino-, Nitro- oder Cyanogruppen, Halogenatome, Alkoxy-, Ester- oder Sulfonatreste mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen darstellt und n eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist.

7. Verbindung nach Anspruch 6 der Formel



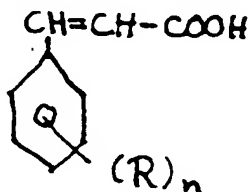
wobei R₁ ein Wasserstoffatom ist, eine Estergruppe oder Ethergruppe vervollständigt und R₂ jeweils unabhängig Aminogruppen, Hydroxylgruppen, Estergruppen, Ethergruppen oder Halogenatome sein können und n wie in Anspruch 6 definiert ist.

8. Verbindung nach Anspruch 6 der Formel



wobei n und R wie in Anspruch 6 definiert sind.

9. Verbindung nach Anspruch 6 der Formel



wobei n und R wie in Anspruch 6 definiert sind.

10. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Molekülkomplex ist, der bei einem pH-Wert von kleiner 7 zerfällt und eine

Substanz freisetzt, die auf Zell n stärker zerstörend wirkt, als der ursprüngliche Molekülkomplex.

11. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Verwendung als Antitumormittel.

12. Arzneimittel, enthaltend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 und einen pharmazeutisch verträglichen inerten Arzneimittelträger.

13. Arzneimittel nach Anspruch 12, enthaltend ein Gemisch aus zumindest 2 verschiedenen Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 11.

14. Arzneimittel nach Anspruch 12 oder 13, das ferner Glucose aufweist.

15. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Tumorbekämpfung.

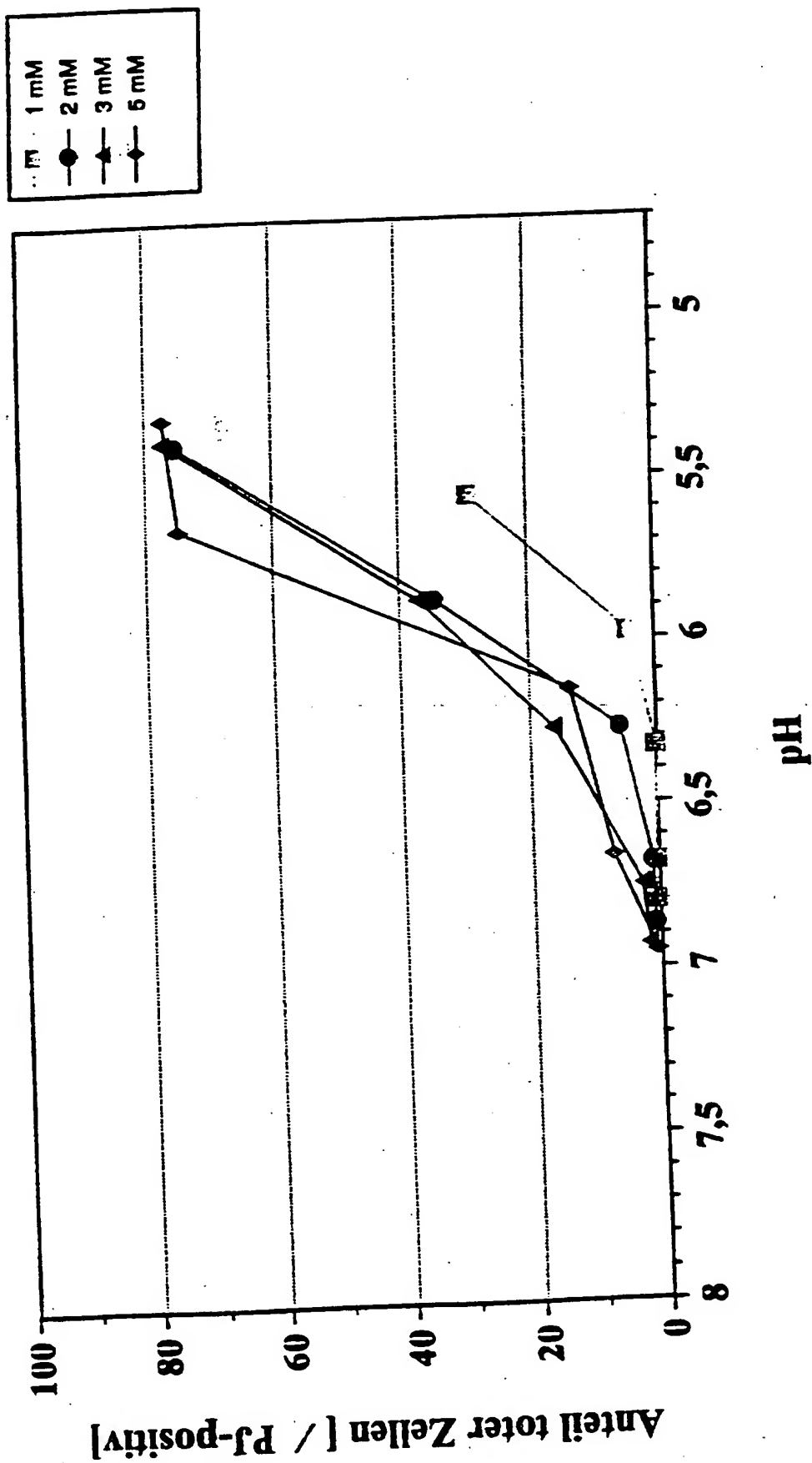
16. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Tumorbekämpfung, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 10 mit einem pharmazeutisch verträglichen inerten Arzneimittelträger zusammengebracht wird.

17. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Behandlung von Krebs.

Differenz: Werte minus Kontrolle

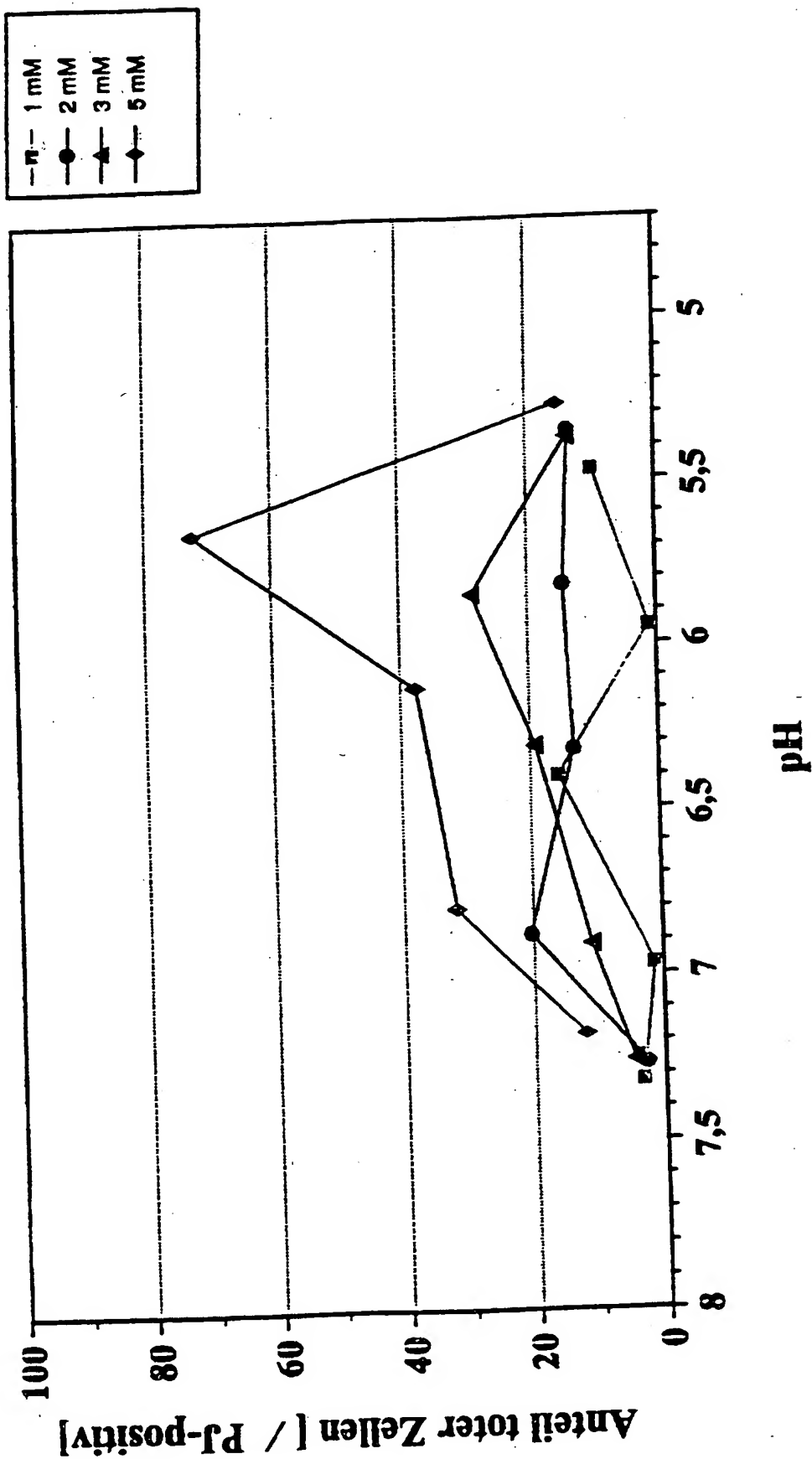
K562

Fig. 1A



Differenz: Werte minus Kontrolle MNC

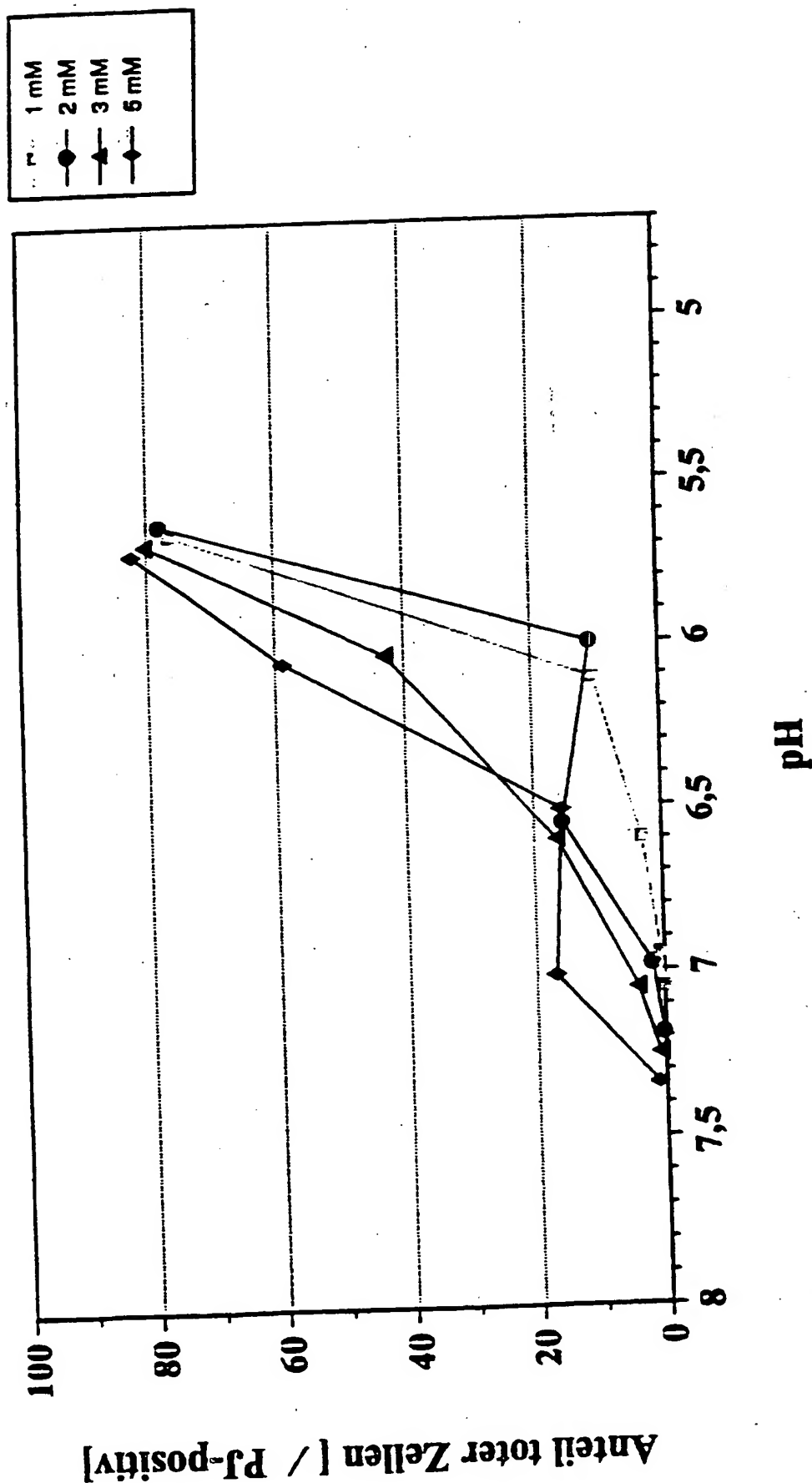
Fig. 1B



Differenz: Werte minus Kontrolle

K562

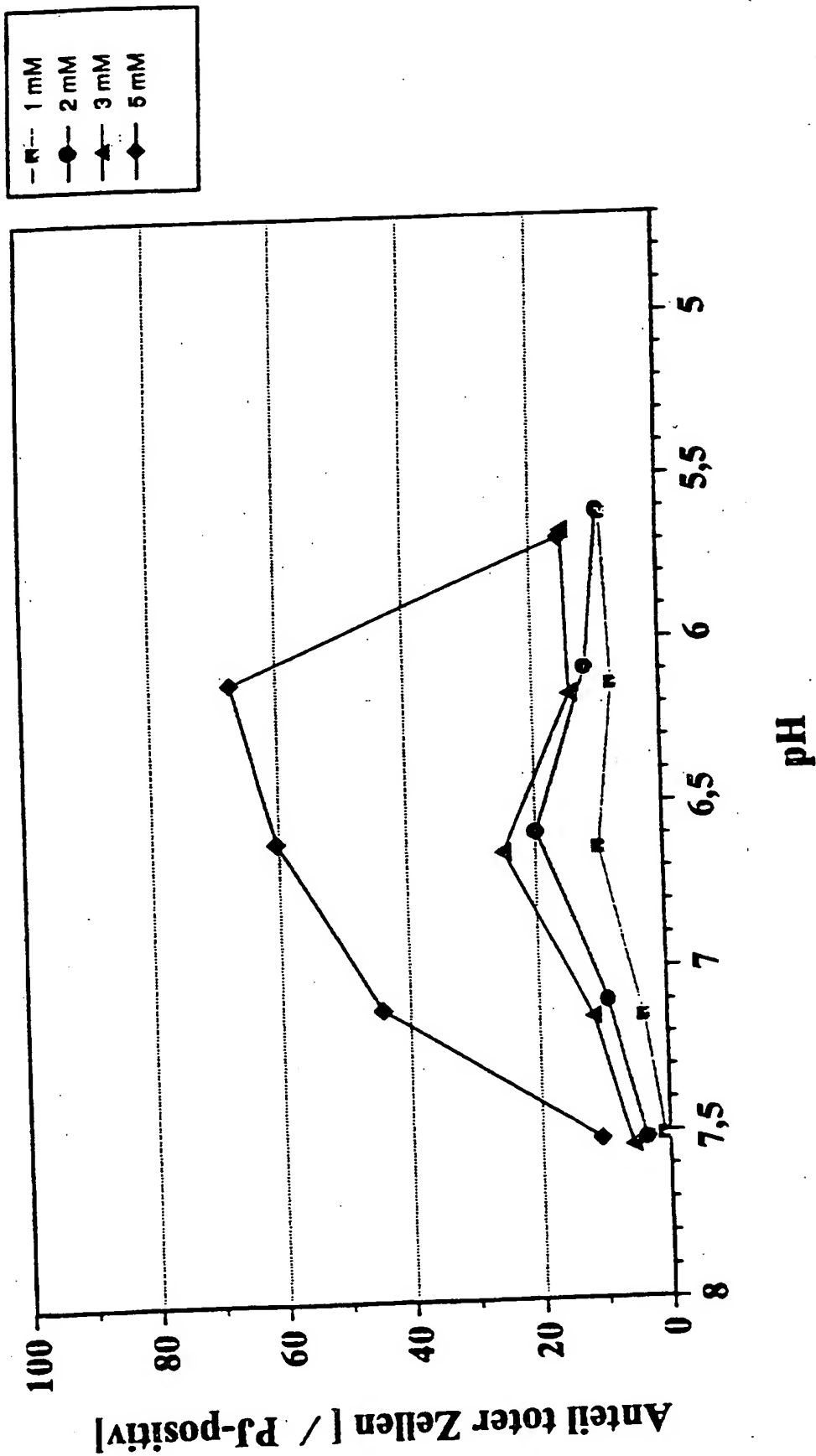
Fig. 2A



Differenz: Werte minus Kontrolle

MNC

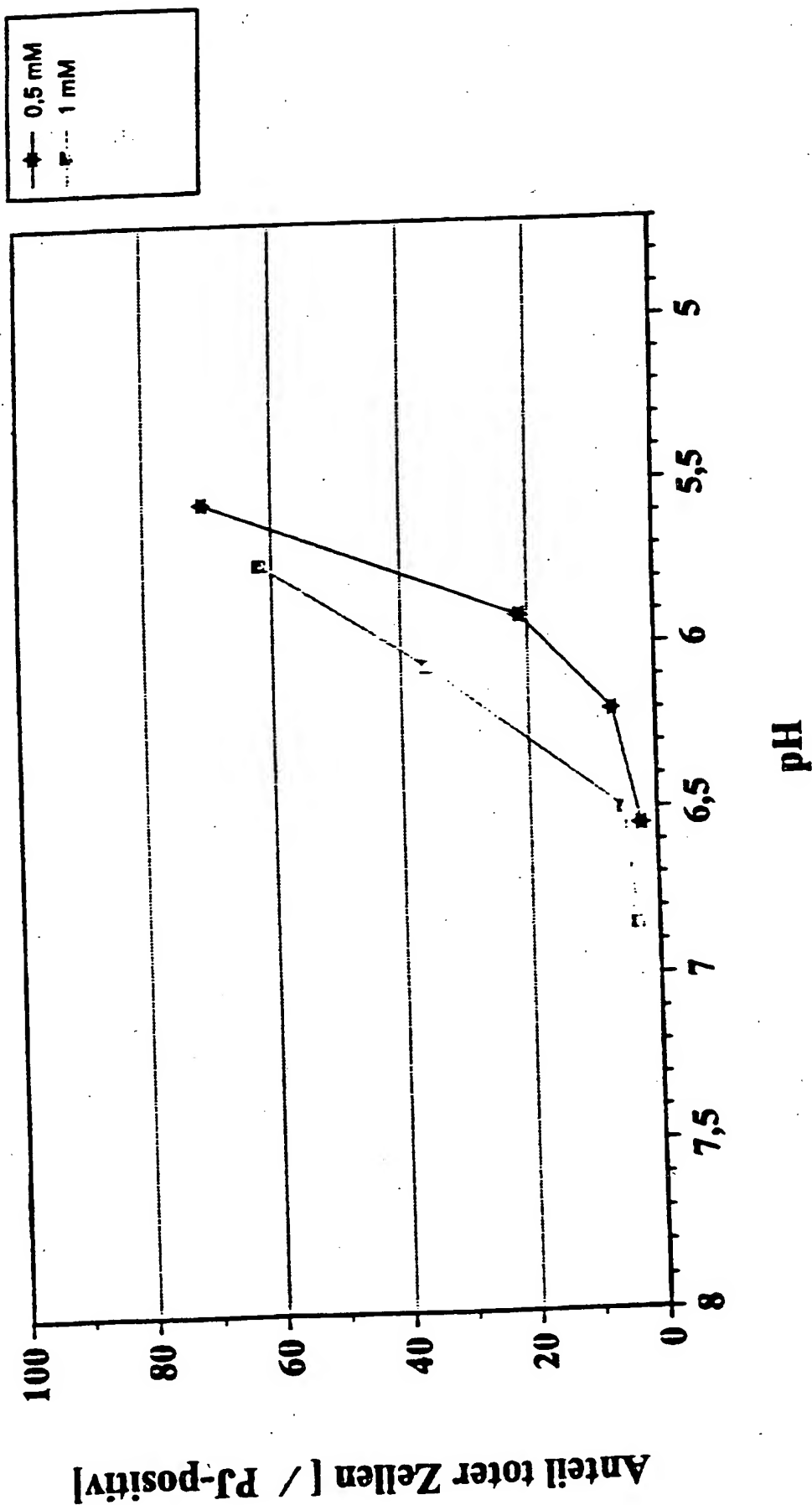
Fig. 2B



Differenz: Werte minus Kontrolle

K562

Fig. 3A



Differenz: Werte minus Kontrolle

MNC

Fig. 3B

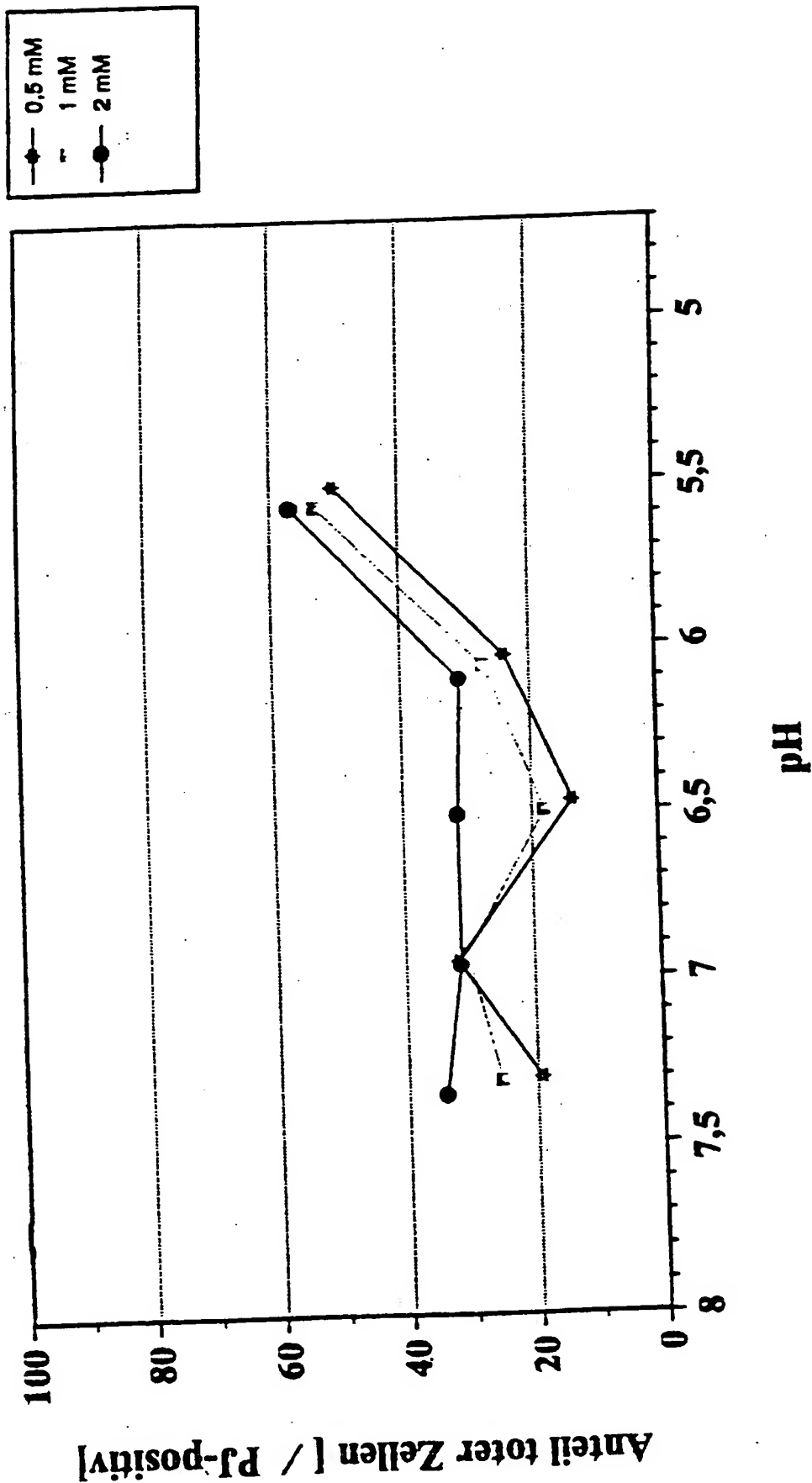
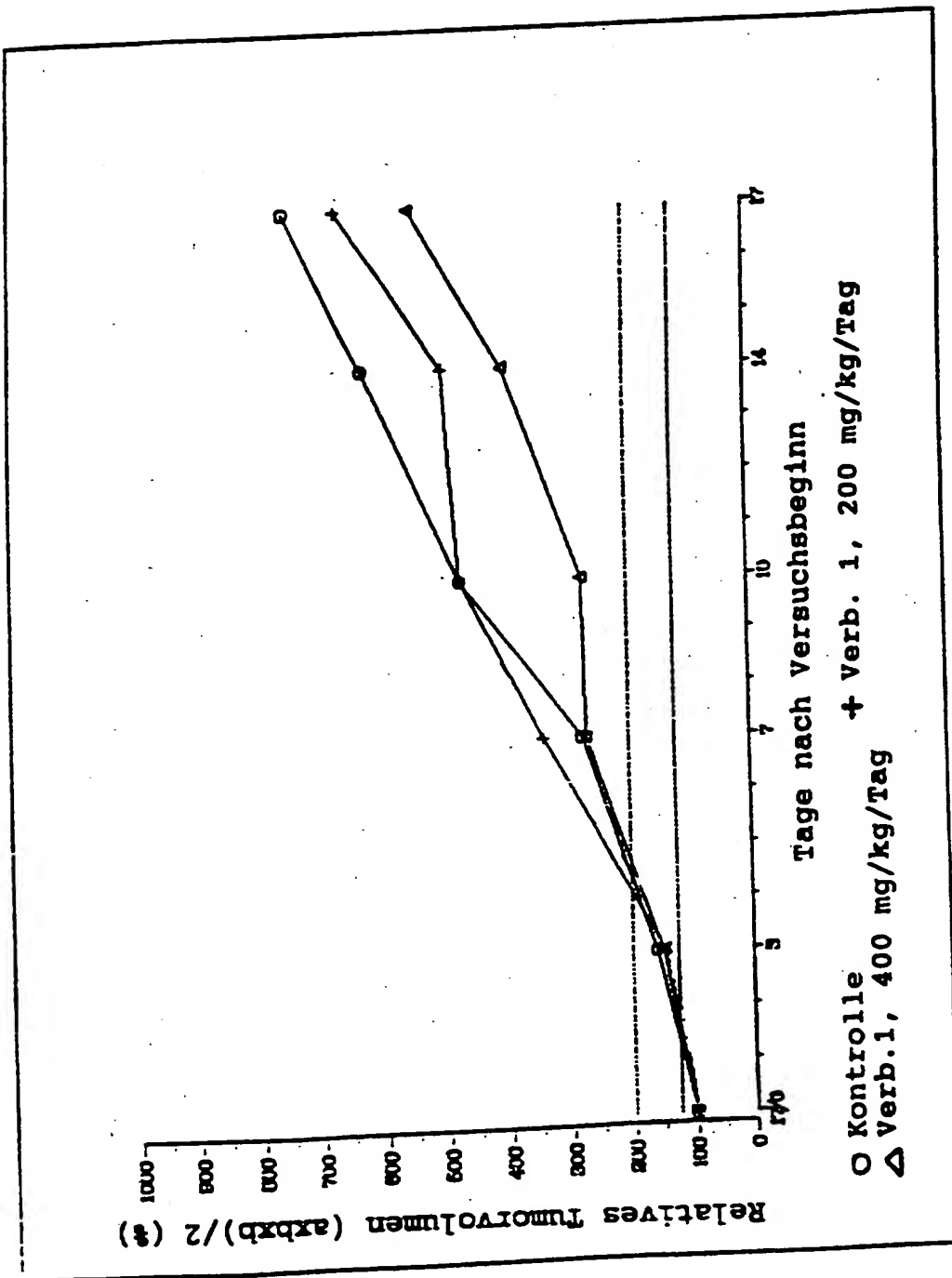


Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/00539A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/00 A61K31/19 A61K31/04 A61K31/235

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEM. PHARM. BULL., vol. 32, no. 3, 1984, pages 1135-1141, XP002011865 S. INAYAMA ET AL.: "Studies on Non-sesquiterpenoid Constituents of Gaillardia pulchella. II. Less Lipophilic Substances, Methyl Caffeate as an Antitumor Catecholic" see the whole document --- -/--	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 August 1996

Date of mailing of the international search report

06.09.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Theuns, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 96/00539

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
0,X	TROPICAL MEDICINE AND INTERNATIONAL HEALTH, vol. 1, no. 3, June 1996, pages 379-384, XP000579657 P.M.LOISEAU ET AL.: "Plasmodium berghei mouse model: antimalarial activity of new alkaloid salts of thiosemicarbazone and acridine derivatives" see page 380, left-hand column, paragraph 1	1-17
X	--- FITOTERAPIA, vol. 66, no. 5, 1995, pages 399-402, XP000579659 J.ULRICOVÁ ET AL.: "Cytoprotective effect of phenolics from Colchicum on rat hepatocytes" see the whole document	1-17
X	--- EUR.J.PHARMACOL., vol. 201, no. 1, 1991, pages 53-58, XP000579658 M.TRAUTMANN ET AL.: "Aspirin-like drugs, ethanol-induced rat gastric injury and mucosal eicosanoid release" see the whole document	1-17
X	--- CANCER RES., vol. 53, no. 4, 15 February 1993, pages 806-809, XP000579667 M.S.ANDERSON ET AL.: "Enhancement of Merocyanine 540-mediated Phototherapy by Salicylate" see the whole document	1-17
X	--- TUMOR BIOL., vol. 15, September 1994, pages 304-310, XP000577049 T.SEVERIN ET AL.: "pH-Dependent LAK Cell Cytotoxicity" cited in the application see the whole document	1-17
X,P	--- DE,A,44 07 484 (W.KREUTZ) 8 June 1995 cited in the application see the whole document	1-17
X	--- WO,A,80 00791 (A.W.SCHWIMMER ET AL.) 1 May 1980 see claim 26	1-17
X	--- WO,A,94 27584 (RADOPATH LIMITED) 8 December 1994 see the whole document	1-17

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 96/00539

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO, A, 95 24897 (RADOPATH LIMITED) 21 September 1995 see the whole document ---	1-17
X	US, A, 4 724 234 (CONE, JR.) 9 February 1988 see the whole document ---	1-17
X	DIALOG (R) FILE 399: CA SEARCH (R), ACCESSION NUMBER 117204558, XP002011866 & CESK. FARM., vol. 41, no. 4-5, 1992, pages 127-129, see abstract ---	1-17
X	S. BUDAVARI ET AL., ED.: "THE MERCK INDEX, 11th Edition" 1989, MERCK & CO., INC., RAHWAY, N.J., U.S.A. XP002011867 see page 78 -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT DE96/ 00539

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

(1) Observation: although claim 17 refers to a method of treating the human or animal body, the search has been based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☒ Claims Nos.: 1 - 17
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

(2) Incompletely searched claims: 1-17.

The definition of compounds in terms of physico-chemical and pharmacological parameters makes a complete search impossible.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/00539

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-4407484	08-06-95	NONE	
WO-A-8000791	01-05-80	US-A- 4327074	27-04-82
		US-A- 4584368	22-04-86
		US-A- 4424348	03-01-84
		AU-B- 534068	05-01-84
		CA-A- 1148086	14-06-83
		CH-A- 652724	29-11-85
		DE-C- 2953223	18-05-89
		FR-A- 2440374	30-05-80
		FR-A- 2449284	12-09-80
		GB-A,B 2055044	25-02-81
		NL-T- 7920107	29-08-80
		SE-B- 461983	23-04-90
		SE-A- 8004369	12-06-80
		AU-B- 5112079	16-04-81
		BE-A- 879390	01-02-80
		US-A- 4337760	06-07-82
		US-A- 4481195	06-11-84
WO-A-9427584	08-12-94	AU-B- 6729794	20-12-94
		BR-A- 9406548	02-01-96
		CA-A- 2163459	08-12-94
		EP-A- 0700287	13-03-96
		FI-A- 955605	22-01-96
		GB-A- 2284153	31-05-95
		LT-A,B 1943	27-12-94
		NO-A- 954702	22-01-96
		ZA-A- 9403489	23-01-95
		AU-B- 1900195	03-10-95
		EP-A- 0677292	18-10-95
		WO-A- 9524897	21-09-95
		GB-A- 2288333	18-10-95
WO-A-9524897	21-09-95	AU-B- 1900195	03-10-95
		AU-B- 6729794	20-12-94
		BR-A- 9406548	02-01-96
		CA-A- 2163459	08-12-94
		EP-A- 0700287	13-03-96
		EP-A- 0677292	18-10-95

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/00539

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9524897		FI-A- 955605	22-01-96
		WO-A- 9427584	08-12-94
		GB-A- 2284153	31-05-95
		GB-A- 2288333	18-10-95
		NO-A- 954702	22-01-96

US-A-4724234	09-02-88	CA-A- 1262864	14-11-89
		US-A- 4935450	19-06-90
		US-A- 4724230	09-02-88

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K31/00 A61K31/19 A61K31/04 A61K31/235

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEM. PHARM. BULL., Bd. 32, Nr. 3, 1984, Seiten 1135-1141, XP002011865 S. INAYAMA ET AL.: "Studies on Non-sesquiterpenoid Constituents of Gaillardia pulchella. II. Less Lipophilic Substances, Methyl Caffeate as an Antitumor Catecholic" siehe das ganze Dokument --- -/--	1-17



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. August 1996

Abschließendes Datum des internationalen Recherchenberichts

06.09.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Theuns, H

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
O,X	TROPICAL MEDICINE AND INTERNATIONAL HEALTH, Bd. 1, Nr. 3, Juni 1996, Seiten 379-384, XP000579657 P.M.LOISEAU ET AL.: "Plasmodium berghei mouse model: antimalarial activity of new alkaloid salts of thiosemicarbazone and acridine derivatives" siehe Seite 380, linke Spalte, Absatz 1 ---	1-17
X	FITOTERAPIA, Bd. 66, Nr. 5, 1995, Seiten 399-402, XP000579659 J.ULRICOVÁ ET AL.: "Cytoprotective effect of phenolics from Colchicum on rat hepatocytes" siehe das ganze Dokument ---	1-17
X	EUR.J.PHARMACOL., Bd. 201, Nr. 1, 1991, Seiten 53-58, XP000579658 M.TRAUTMANN ET AL.: "Aspirin-like drugs, ethanol-induced rat gastric injury and mucosal eicosanoid release" siehe das ganze Dokument ---	1-17
X	CANCER RES., Bd. 53, Nr. 4, 15.Februar 1993, Seiten 806-809, XP000579667 M.S.ANDERSON ET AL.: "Enhancement of Merocyanine 540-mediated Phototherapy by Salicylate" siehe das ganze Dokument ---	1-17
X	TUMOR BIOL., Bd. 15, September 1994, Seiten 304-310, XP000577049 T.SEVERIN ET AL.: "pH-Dependent LAK Cell Cytotoxicity" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-17
X,P	DE,A,44 07 484 (W.KREUTZ) 8.Juni 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-17
X	WO,A,80 00791 (A.W.SCHWIMMER ET AL.) 1.Mai 1980 siehe Anspruch 26 ---	1-17
1 X	WO,A,94 27584 (RADOPATH LIMITED) 8.Dezember 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-17

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Ber. Anspruch Nr.
X,P	WO,A,95 24897 (RADOPATH LIMITED) 21.September 1995 siehe das ganze Dokument ---	1-17
X	US,A,4 724 234 (CONE, JR.) 9.Februar 1988 siehe das ganze Dokument ---	1-17
X	DIALOG (R) FILE 399: CA SEARCH (R), ACCESSION NUMBER 117204558, XP002011866 & CESK. FARM., Bd. 41, Nr. 4-5, 1992, Seiten 127-129, siehe Zusammenfassung ---	1-17
X	S.BUDAVARI ET AL., ED.: "THE MERCK INDEX, 11th Edition" 1989 , MERCK & CO., INC. , RAHWAY, N.J., U.S.A. XP002011867 siehe Seite 78 -----	1-17

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 17
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl Anspruch 17 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche gegründet auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-17
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
Unvollständig recherchierte Patentansprüche: 1-17
Die Definition von Verbindungen über physikalisch-chemischen und pharmakologischen Parametern macht eine vollständige Recherche im wesentlichen unmöglich.
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00539

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-4407484	08-06-95	KEINE	
WO-A-8000791	01-05-80	US-A- 4327074	27-04-82
		US-A- 4584368	22-04-86
		US-A- 4424348	03-01-84
		AU-B- 534068	05-01-84
		CA-A- 1148086	14-06-83
		CH-A- 652724	29-11-85
		DE-C- 2953223	18-05-89
		FR-A- 2440374	30-05-80
		FR-A- 2449284	12-09-80
		GB-A, B 2055044	25-02-81
		NL-T- 7920107	29-08-80
		SE-B- 461983	23-04-90
		SE-A- 8004369	12-06-80
		AU-B- 5112079	16-04-81
		BE-A- 879390	01-02-80
		US-A- 4337760	06-07-82
		US-A- 4481195	06-11-84
WO-A-9427584	08-12-94	AU-B- 6729794	20-12-94
		BR-A- 9406548	02-01-96
		CA-A- 2163459	08-12-94
		EP-A- 0700287	13-03-96
		FI-A- 955605	22-01-96
		GB-A- 2284153	31-05-95
		LT-A, B 1943	27-12-94
		NO-A- 954702	22-01-96
		ZA-A- 9403489	23-01-95
		AU-B- 1900195	03-10-95
		EP-A- 0677292	18-10-95
		WO-A- 9524897	21-09-95
		GB-A- 2288333	18-10-95
WO-A-9524897	21-09-95	AU-B- 1900195	03-10-95
		AU-B- 6729794	20-12-94
		BR-A- 9406548	02-01-96
		CA-A- 2163459	08-12-94
		EP-A- 0700287	13-03-96
		EP-A- 0677292	18-10-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationaler Aktenzeichen

PCT/DE 96/00539

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9524897		FI-A- 955605	22-01-96
		WO-A- 9427584	08-12-94
		GB-A- 2284153	31-05-95
		GB-A- 2288333	18-10-95
		NO-A- 954702	22-01-96

US-A-4724234	09-02-88	CA-A- 1262864	14-11-89
		US-A- 4935450	19-06-90
		US-A- 4724230	09-02-88
